

УДК 577.1

ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ В ЖИВОТНЫХ ТКАНЯХ ИЗОФОРМЫ 2-ОКСОАДИПАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ, КОДИРУЕМОЙ ГЕНОМ *DHTKD1*, НЕ ОБРАЗУЮТСЯ ПРИ ЭКСПРЕССИИ *DHTKD1* ЧЕЛОВЕКА В БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИЛИ ДРОЖЖЕВОЙ СИСТЕМАХ*

© 2020 А.И. Бойко^{1**}, А.В. Аргюхов^{1,2}, Т. Кэне³, М. Луиджи ди Сальво⁴, М.К. Бонаккорси ди Патти⁴, Р. Контестабиле⁴, А. Трамонти^{4,5}, В.И. Буник^{1,2,6**}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия; электронная почта: boiko.sash@gmail.com, bunik@belozersky.msu.ru

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

³ Институт экспериментальной медицины Университета имени Отто фон Гюрке, 39120 Магдебург, Германия

⁴ Римский университет Ла Сапиенца, Департамент биологических наук имени А. Росси Фанелли, 00185 Рим, Италия

⁵ Институт молекулярной биологии и патологии, Национальный исследовательский совет, 00185, Рим, Италия

⁶ Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, кафедра биологической химии, 119146 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.06.2020

После доработки 25.06.2020

Принята к публикации 26.06.2020

В отличие от представленной во всех тканях животных 2-оксоглутаратдегидрогеназы (ОГДГ, ген *OGDH*), наличие в тканях ее изофермента – 2-оксоадипатдегидрогеназы (ОАДГ, ген *DHTKD1*) – зависит от многих факторов, и фенотип при мутациях *DHTKD1* выражен редко. Поскольку оба изофермента катализируют превращения как 2-оксоглутарата, так и 2-оксоадипата, физиологическая роль ОАДГ не очевидна. По аналогии с другими представителями семейства дегидрогеназ 2-оксокислот считают, что ОАДГ является компонентом полиферментного комплекса, катализирующего окислительное декарбоксилирование 2-оксоадипата. Целью настоящего исследования являлась молекулярная характеристика ОАДГ животных тканей. Филогенетический анализ дегидрогеназ 2-оксокислот обнаружил ОАДГ лишь у животных и слизевика *Dictyostelium discoideum* в составе общей с бактериальными ОГДГ ветви. Исследование частично очищенной из животных тканей ОАДГ методами иммуноблоттинга и масс-спектрометрии показало, что фермент представлен двумя изоформами с мол. массами ~130 и 70 кДа. Эти изоформы не детектируются при получении ОАДГ человека в бактериальной или дрожжевой системах экспрессии, где молекулярная масса ОАДГ соответствует ожидаемой (~100 кДа). Таким образом, обнаруженные изоформы ОАДГ могут быть продуктами специфической для животных регуляции экспрессии *DHTKD1* и/или посттрансляционных модификаций фермента. Положение идентифицированных пептидов ОАДГ в структуре белка свидетельствует о том, что у изоформы 70 кДа отсутствует N-концевой фрагмент, но сохранен активный центр. Поскольку N-концевой домен ОГДГ необходим для формирования полиферментного комплекса, можно предположить, что изоформа ОАДГ 70 кДа катализирует неокислительные превращения дикарбоновых 2-оксокислот, которые не требуют полиферментной структуры. В этом случае соотношение охарактеризованных изоформ ОАДГ в тканях животных может отражать соотношение окислительного и неокислительного декарбоксилирования 2-оксоадипата, катализируемого ОАДГ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *DHTKD1*, *OGDH*, изофермент 2-оксоглутаратдегидрогеназы, изоформы 2-оксоадипатдегидрогеназы, карболигаза, посттрансляционные модификации.

DOI: 10.31857/S0320972520080072

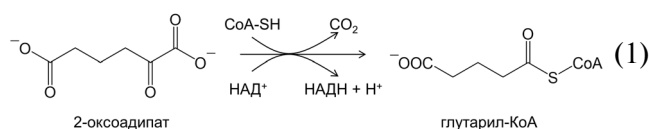
Принятые сокращения: *DHTKD1* – ген, кодирующий 2-оксоадипатдегидрогеназу (белок 1, содержащий дегидрогеназный и транскетотазный домены); ОАДГ – 2-оксоадипатдегидрогеназа; ОАДК – полиферментный комплекс 2-оксоадипатдегидрогеназы; ОГДГ – 2-оксоглутаратдегидрогеназа.

* Ускоренная публикация. Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ20-167, 30.07.2020.

** Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Продукт гена *DHTKD1* 2-оксоадипатдегидрогеназа (ОАДГ) является одним из белков, который был обнаружен путем автоматической аннотации геномов животных. По сумме идентичных аминокислот и консервативных замен последовательность ОАДГ имеет 56% сходство с кодируемой геном *OGDH* 2-оксоглутаратдегидрогеназой (ОГДГ) [1] — ключевым ферментом цикла трикарбоновых кислот. При этом оба фермента катализируют превращения дикарбоновых 2-оксокислот 2-оксоглутарата и 2-оксоадипата, хоть и с разной эффективностью [2–4]. Структурное и функциональное сходство позволяет рассматривать ОАДГ и ОГДГ как изоферменты. Энцимологические исследования рекомбинантной ОАДГ [5] показали, что в составе 2-оксоадипатдегидрогеназного полиферментного комплекса (ОАДК), собранного *in vitro* из продуцируемых в бактериальной системе компонентов, ОАДГ катализирует аналогичную ОГДГ реакцию окислительного декарбоксилирования 2-оксоадипата (реакция 1):



Однако проявления мутаций гена *DHTKD1* у человека, как и накопление 2-оксо- и 2-аминоадипата — промежуточных соединений катаболизма лизина и триптофана — при таких мутациях [6, 7], принципиально отличаются от последствий мутаций *OGDH*, которые несовместимы с жизнью [8], вследствие тяжелых нарушений функции ЦНС [9]. Полученные при исследовании мутантов данные указывают на отсутствие взаимозаменяемости ОАДГ и ОГДГ на уровне организма, несмотря на сходство их каталитических функций. Таким образом, *in vivo* функции ОАДГ и ОГДГ отличаются значительно сильнее, чем *in vitro*.

Изучение физиологического значения катализируемой ОАДГ реакции окислительного декарбоксилирования 2-оксоадипата — общего интермедиата катаболизма лизина и триптофана — затруднено ввиду того, что эти метаболические пути мало изучены и в разной степени выражены в разных типах клеток и тканей. Кроме того, значительная вариабельность экспрессии *DHTKD1* как в разных органах и тканях одного организма, так и на уровне популяции, приводит к отсутствию четко выраженного фенотипа при мутациях этого гена. Подавление синтеза ОАДГ в клетках нарушает биоге-

нез и энергетический метаболизм митохондрий [10], а на уровне организма изменения экспрессии *DHTKD1* ассоциированы с развитием системных патологий обмена глюкозы, таких как диабет и ожирение [11–13]. Накопление 2-оксо- и 2-аминоадипата вследствие мутаций функционально важных остатков ассоциировано с нервно-мышечными патологиями [6, 7, 14]. С другой стороны, 2-аминоадипат показал нейропротекторное действие в моделях болезни Паркинсона [15], что свидетельствует о неоднозначности (пато)физиологической роли катализируемой ОАДГ реакции. Таким образом, исследования ОАДГ весьма актуальны как с фундаментальной, так и медицинской точки зрения.

В данной работе охарактеризованы структурные особенности ОАДГ, которые лежат в основе физиологически значимой регуляции функций фермента в тканях животных. Показаны отличия мол. массы ОАДГ, существующей в тканях крысы, от массы, рассчитанной по первичной структуре и свойственной рекомбинантному белку, синтезируемому в бактериальной или дрожжевой системах экспрессии гена *DHTKD1* человека. Это свидетельствует о существовании альтернативных белковых продуктов гена *DHTKD1* и/или их посттрансляционных модификаций, которые отсутствуют у рекомбинантной ОАДГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Все использованные реактивы были наивысшей доступной чистоты. Реактивы приобретали у следующих производителей: полиэтиленгликоль-6000, ЭДТА, PMSF — «Serva» (Германия), коктейль ингибиторов протеаз — «Roche» (Швейцария), метанол — «Merck» (Германия), Triton-X100, KH_2PO_4 , NaCl — «Panreac», (Испания), глицерол, сахароза — «Biomedicals, LLC» (США), MgCl_2 , CaCl_2 — «ДИА-М» (Россия), MOPS — «Хеликон» (Россия), дрожжевой экстракт — «Fluka» (США), Trypton — «GeneSpin» (Италия), глюкоза — «VWR» (США), остальные органические соединения — «Sigma» (США).

Животные. Для получения гомогенатов тканей крыс использовали белых крыс-самцов линии Wistar массой 300–350 г, содержащихся на стандартном рационе в виварии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Животные имели постоянный доступ к воде и пище и находились при световом цикле 12/12 ч (световая фаза с 9:00 до 21:00 по местному времени), температуре $(21 \pm 2)^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха $(53 \pm 5)\%$. Крыс умерщвля-

ли методом декапитации с помощью гильотины.

Приготовление гомогенатов и обогащенных ОАДК фракций из тканей крысы. Гомогенаты тканей крыс готовили по опубликованному ранее протоколу [16]. Препараты сердца, печени и мозга, обогащенные ОАДК, получали согласно опубликованной методике [3].

Экспрессия *DHTKD1* в бактериальной системе. кДНК гена *DHTKD1* была встроена в вектор pET28 для экспрессии в клетках *E. coli* BL21(DE3) по стандартному протоколу [17]. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 2550 g и замораживали при -20°C . Лизат бактерий получали путем инкубации ресуспендированных клеточных осадков с лизоцимом и разрушения мембран ультразвуком. Рекомбинантный белок с дополнительным гексагистиридиновым пептидом на С-конце был очищен из бактериального лизата на гранулах Ni-NTA агарозы с использованием 50 mM KH_2PO_4 , pH 8,0, содержащем 300 mM KCl с 300 mM имидазолом.

Экспрессия *DHTKD1* в дрожжевой системе. Вектор pIB2, содержащий кДНК гена *DHTKD1* под GAP-промотором, линейаризовали с помощью рестриктазы SalI и использовали для трансформации компетентных клеток *Pichia pastoris* GS115 (his4) путем электропорации по описанному протоколу [18]. Дрожжи растили в стерильной среде YPD с 2%-ной глюкозой в течение ~48 ч при температуре 28°C и перемешивании, затем осаждали и замораживали. Клетки лизировали с помощью стеклянных бусин с добавлением ДНКазы 1 и РНКазы. Очистку ОАДГ с гексагистиридиновым пептидом на С-конце проводили на колонке Ni-NTA Superflow 1 ml Cartridge («Qiagen», Германия), уравновешенной буфером 50 mM KH_2PO_4 , pH 8,0, 300 mM KCl. Элюцию ОАДГ с колонки проводили тем же буфером с градиентным увеличением концентрации имидазола с 30 mM до 300 mM на хроматографической системе ÄKTA Prime («GE Healthcare», США).

Ds-Na-ПААГ электрофорез и иммуноблоттинг. К образцам добавляли солибилизирующий буфер (250 mM Tris-HCl, 8%-ный Ds-Na, 40%-ный (v/v) глицерин, 20%-ный β -меркаптоэтанол и 0,04%-ный бромфеноловый синий, pH 6,8) в соотношении 3 : 1. Образцы кипятили в течение 5 мин и остужали до комнатной температуры перед нанесением.

Для детекции ОАДГ методом иммуноблоттинга использовали стандартный протокол и антитела мыши к ОАДГ #H00055526-B01P (1:500, «Abnova», Тайвань). В качестве вторичных антител использовали антитела, конъюги-

рованные с пероксидазой хрена («Boehringer Mannheim GmbH», Германия) со свежеприготовленным хемилюминесцентным субстратом (10 мг 3-амино-9-этил-карбазола растворяли в 25 мл 50 mM CH_3COONa , pH 5,0, содержащем 5%-ный диметилформамид, и смешивали с 30%-ной перекисью водорода в соотношении 1 : 2000) или P-GAM Iss (1:1000 «Имтек», Россия) с набором субстратов ECL («Bio-Rad», США). Фотографии полос были получены с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc MP («Bio-Rad»).

Мол. массу белковых полос, реагирующих с антителами на ОАДГ, определяли из линейной зависимости логарифма мол. массы белка от его подвижности в геле, используя калибровочный график, построенный для белков-маркеров Unstained Protein Standards («Bio-Rad»).

Идентификация пептидов ОАДГ в тканях крысы. Идентификацию белков в полосах, соответствующих мол. массам 130 ± 10 кДа и 70 ± 5 кДа на гелях после Ds-Na-ПААГ электрофореза проводили методом tandemной масс-спектрометрии (LC-MS/MS) после трипсинолиза как описано ранее [19]. Белки крысы идентифицировали с использованием последовательностей из базы данных SwissProt для крысы.

Построение филогенетического дерева семейства дегидрогеназ 2-оксокислот. Для построения филогенетического дерева был проведен поиск гомологов последовательности ОАДГ крысы (идентификатор UniProt Q4KLP0) с помощью сервиса BLASTP [20] по базам данных Swiss-Prot и RefSeq с параметрами поиска, выставленными по умолчанию, за исключением порога E-value 10^{-3} и размера слова 2. При этом исключали последовательности, полученные автоматической трансляцией ДНК (префикс XM_/XP_), и неуникальные последовательности (префикс WP_). Результаты поиска по двум базам данных скачивали в виде последовательностей в формате fasta, исключая повторяющиеся находки. Строили их множественное выравнивание с помощью алгоритма Muscle в программе MEGA X [21]. Результат выравнивания визуализировали в виде филогенетического дерева, построенного методом объединения соседей (Neighbour-joining).

Моделирование. Для предсказания трехмерной структуры мономера ОАДГ млекопитающих использовали аминокислотную последовательность белка крысы, доступную в базе UniProt по идентификатору Q4KLP0 (DHTK1_RAT). С учетом результатов нашего филогенетического анализа о близости ОАДГ к бактериальным ОАДГ, для построения модели ОАДГ была выбрана разрешенная пространственная структура

холофермента микобактериальной ОГДГ (идентификатор RSCB PDB 2XT6). Модель была построена с помощью сервера I-TASSER [22]. Для визуализации структуры белка использовали программу PyMOL 2.0.4. (Schrödinger, Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Филогенетический анализ возникновения белка ОАДГ. На рис. 1 представлено филогенетическое дерево дегидрогеназ 2-оксокислот, из которого видно, что отделение кодируемой геном *DHTKD1* ОАДГ от ветви ОГДГ произошло в ходе ранней эволюции многоклеточных эукариот. В настоящее время кодируемая геном *DHTKD1* ОАДГ аннотирована лишь у животных и слизевика *Dictyostelium discoideum* (рис. 1). Отсюда можно заключить, что ОАДГ возникла у организмов, перешедших на питание другими организмами и в связи с этим утративших способность к биосинтезу ряда необходимых для метаболизма соединений. В частности, в ходе эволюции как животные, так и *Dictyostelium* независимо утратили способность синтезировать лизин и триптофан [23], в катаболизме которых участвует ОАДГ.

Другим интересным результатом проведенного филогенетического анализа является обнаруженная близость эукариотического белка ОАДГ к бактериальным ОГДГ (рис. 1), с которыми ОАДГ эукариот образует один кластер. Такое структурное сходство может свидетельствовать об эволюционной потребности в сохранении некоторых функций и свойств бактериальных ОГДГ, утраченных эукариотическими ОГДГ вследствие их специализации. В частности, по сравнению с бактериальными комплексами, эукариотические используют дополнительные белок-белковые взаимодействия при самосборке полиферментных комплексов и характеризуются усилением селективности превращений 2-оксо субстрата [24].

Таким образом, отделение ОАДГ от ее гомолога ОГДГ, по-видимому, отражает процесс разделения функций ОГДГ и ОАДГ в ходе эволюции и необходимость независимой от ОГДГ регуляции функции ОАДГ.

Изоформы ОАДГ в тканях крыс. Анализ гомогенатов тканей крыс методом иммуноблоттинга показал, что специфичные по отношению к ОАДГ антитела реагируют с двумя белковыми полосами (рис. 2, а). Кажущиеся молекулярные массы данных белковых полос были определены усреднением результатов анализа 25 образцов в пяти независимых экспериментах и составили 127 ± 2 кДа и 69 ± 1 кДа. При этом в некоторых

случаях низкомолекулярная полоса была представлена двумя близкорасположенными полосами, характерными для белков, образующих внутримолекулярные дисульфидные связи [25]. С учетом ошибки определения для простоты изложения массы изоформ округлены до 130 и 70 кДа. Ни одна из данных полос не соответствует 100 кДа – массе нативной ОАДГ, рассчитанной на основе аминокислотной последовательности белка без пептида митохондриальной локализации, вес которого составляет 2,5 кДа. При этом высокомолекулярная полоса 130 кДа обнаруживалась, в основном, в печени (рис 2, а), где уровень экспрессии *DHTKD1* и представленность ОАДГ максимальны по сравнению с другими тканями [3]. С помощью масс-спектрометрии показано наличие пептидов ОАДГ крысы в обеих белковых полосах, реагирующих с антителами на ОАДГ (рис. 2, б). Полученные данные указывают на то, что идентифицированные иммуноблоттингом изоформы ОАДГ, наблюдаемые мол. массы которых существенно отличаются от массы, рассчитанной для белковой последовательности, связаны с изменениями структуры ОАДГ.

По результатам высокопроизводительных исследований известно, что ОАДГ взаимодействует с убиквитином и убиквитин-подобными белками (NEDD8, SUMO1) [26, 27], и в одном из таких исследований было показано убиквитинилирование ОАДГ по остаткам Lys537, Lys881 и Lys886 (рис. 3). Данная модификация, в отличие от других, показанных для ОАДГ (рис. 3), может увеличивать массу фермента от 100 кДа до наблюдаемой нами массы 130 кДа и более.

При идентификации убиквитинилированных белков с помощью масс-спектрометрии после трипсинолиза были обнаружены пептиды, содержащие характерные триплеты Lys-ε-Gly-Gly [28]. Однако авторы не смогли детектировать пептиды с такими триплетами в исследованных образцах печени крысы, поэтому возможность модификации ОАДГ убиквитином или убиквитин-подобными белками требует дальнейших исследований. Тем не менее, пептид, позволяющий детектировать белок ОАДГ, был идентифицирован и при анализе области геля выше 130 кДа. Этот результат свидетельствует о существовании и более высокомолекулярных, чем детектируемая форма 130 кДа, вариантов ОАДГ, хотя уровень таких высокомолекулярных форм низок по сравнению с основными формами, детектированными методом иммуноблоттинга (рис. 2, а).

Определенные масс-спектрометрическим анализом пептиды ОАДГ в области белков с

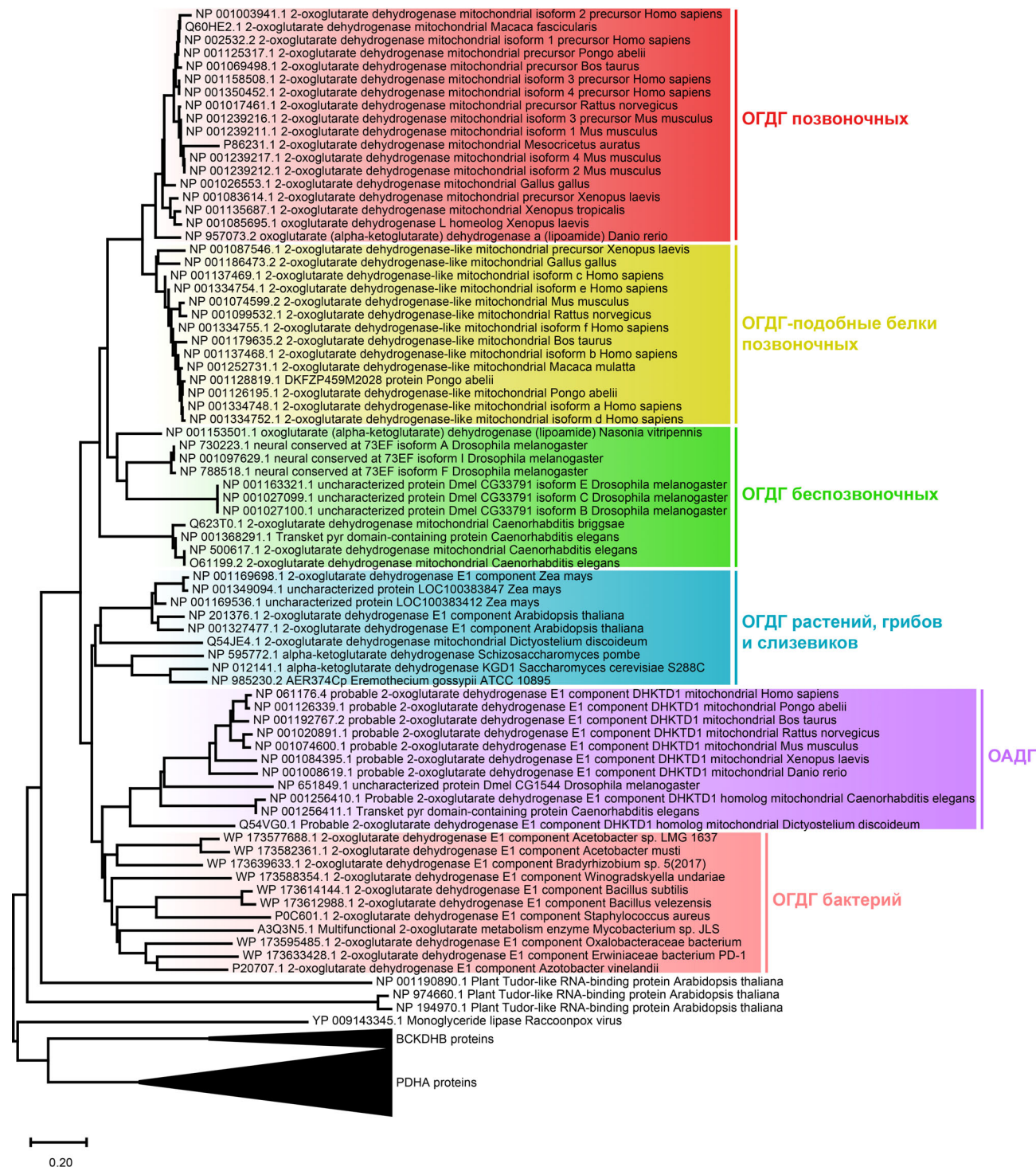


Рис. 1. Филогенетическое дерево белковых последовательностей дегидрогеназ 2-оксоуксусной кислоты. Для оптимальной визуализации результатов α -субъединицы пируватдегидрогеназы (PDHA proteins) приведены в виде одной общей ветви, аналогично показаны β -субъединицы дегидрогеназы разветвленных 2-оксоуксусной кислоты (BCKDHB proteins). Размерность масштабной шкалы – количество аминокислотных замен на остаток. (С цветными вариантами рис. 1–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

молекулярной массой 70 кДа (рис. 2, б) изображены на модели мономера белка (рис. 4), полученной с использованием структуры ОДГ *Mycobacterium smegmatis*. Как видно из рис. 4,

идентифицированные пептиды ОАДГ достаточно равномерно покрывают дегидрогеназный, транскетотазный и С-концевой домены ОАДГ, но отсутствуют в N-концевом фрагменте белка.

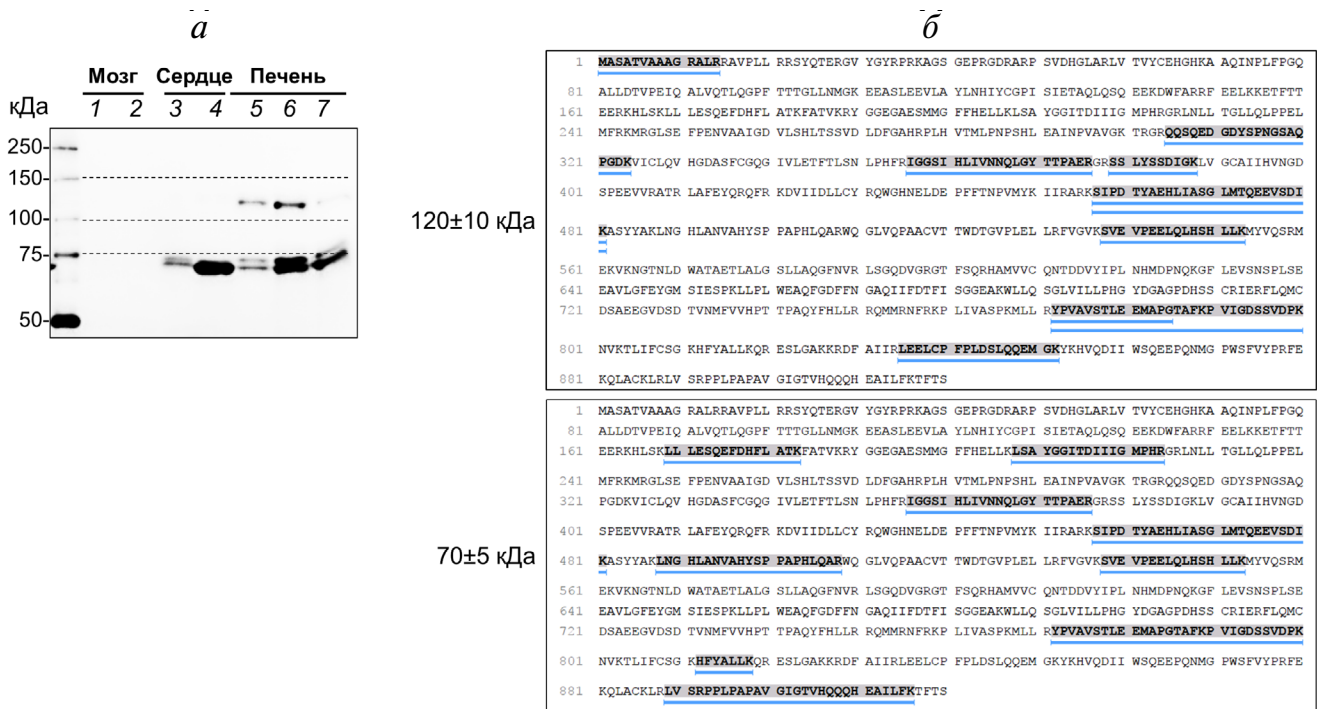


Рис. 2. Изоформы ОАДГ в тканях крысы. *а* – Белки, реагирующие с антителами на ОАДГ в препаратах фермента из мозга, сердца и печени. 1, 2 – Гомогенат коры головного мозга, 3 – гомогенат сердца, 4 – препарат сердца, обогащенный ОАДК, 5 – гомогенат печени, 6 и 7 – два препарата печени с разной степенью обогащенности ОАДК. Для каждого образца нанесено ~35 мкг белка. Пунктиром обозначены уровни мол. масс белковых маркеров 75, 100 и 150 кДа; *б* – пептиды ОАДГ, идентифицированные методом LC-MS/MS в препарате из печени крысы, выделены и подчеркнуты. Масс-спектрометрический анализ проводили в участках геля, соответствующих интервалам мол. масс 110–130 кДа и 65–75 кДа

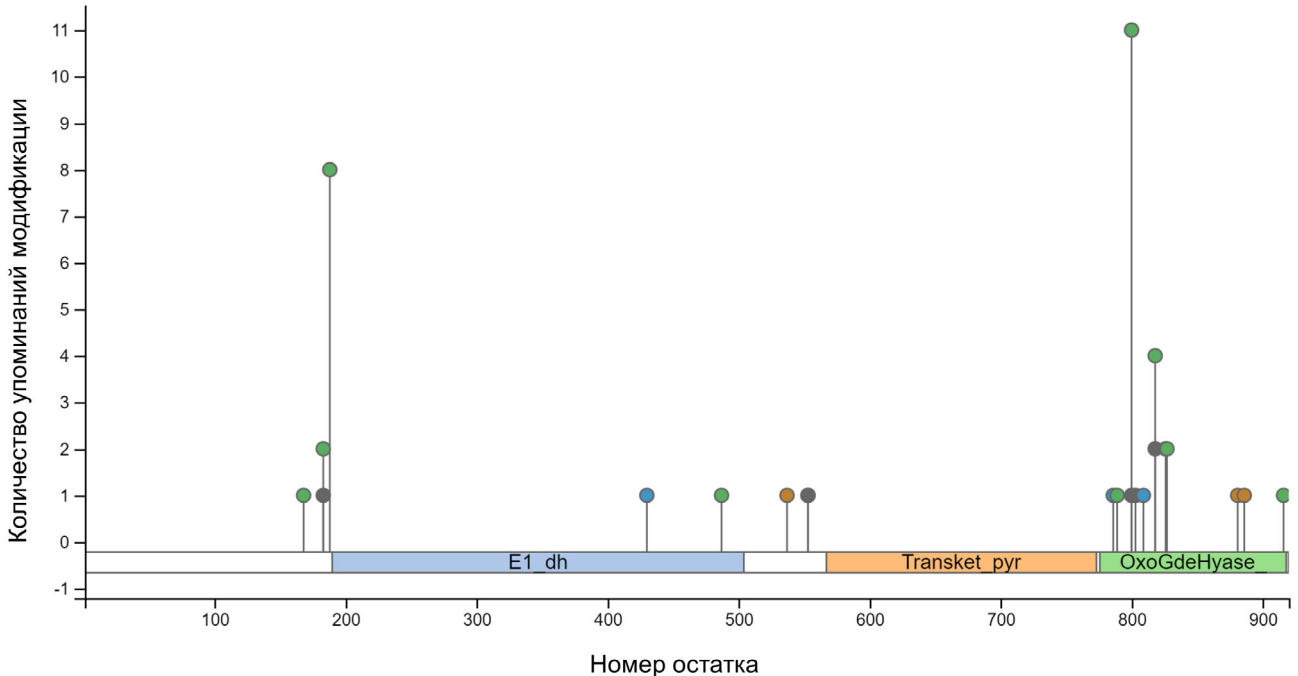


Рис. 3. Модификации ОАДГ крысы, определенные в высокопроизводительных скрининговых исследованиях, по данным базы PhosphoSitePlus v.6.5.9.1. [29]. Домены последовательности ОАДГ обозначены разными цветами: голубым «E1_dh» – дегидрогеназный домен, оранжевым «Transket_pyr» – транскетолозный пиримидин-связывающий домен, зеленым «OxoGdeHyase» – С-концевой домен дегидрогеназы 2-оксоацетил-КоА. Модификации указанных остатков последовательности включают ацетилирование (зеленые точки), фосфорилирование (голубые точки), сукцинирование (серые точки), убиквитинилирование (коричневые точки)

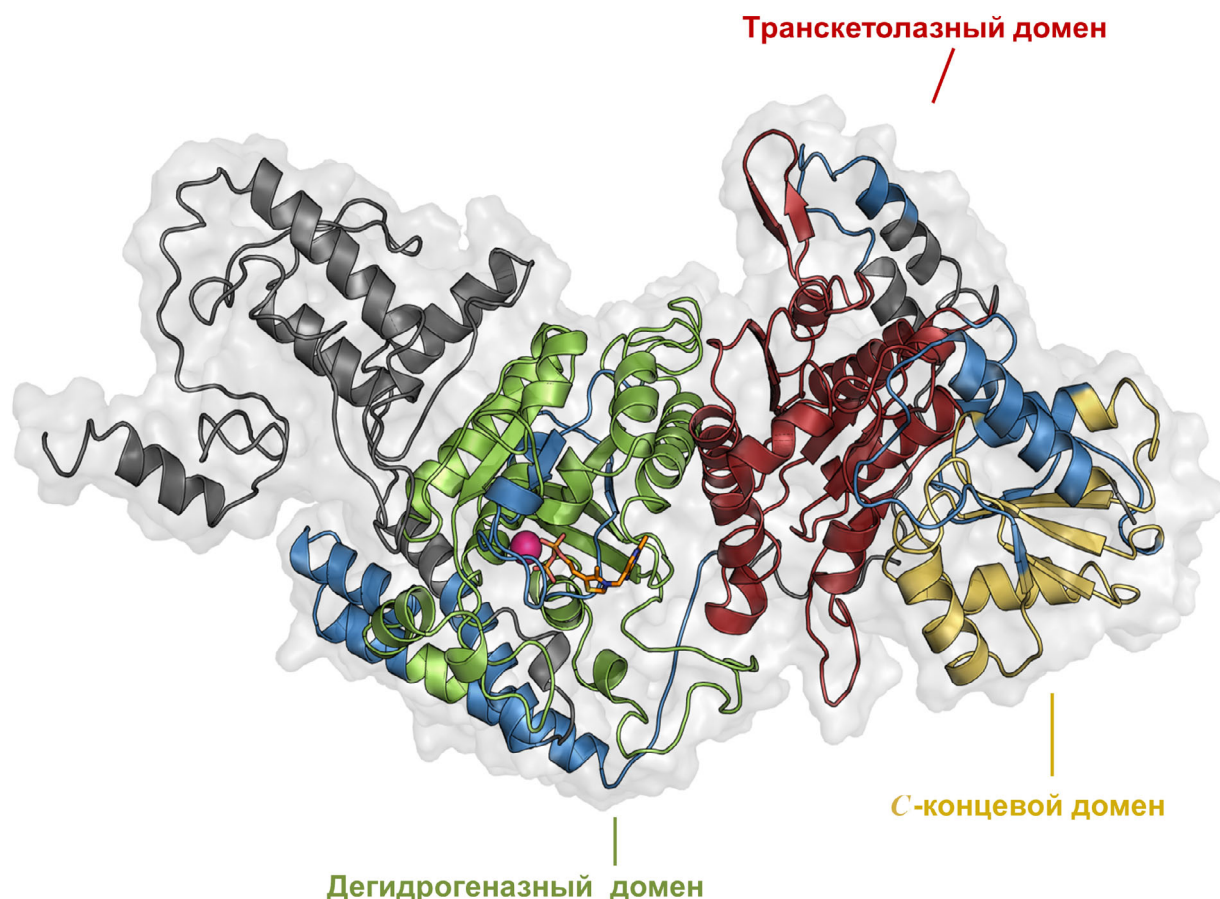


Рис. 4. Модель мономера ОАДГ крысы с коферментами тиаминдифосфатом и Mg^{2+} . Ион магния окрашен розовым цветом, молекула тиаминдифосфата — оранжевым. Домены белка обозначены разными цветами: зеленым — дегидрогеназный домен E1-компонентов комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот, красным — транскетолазный пиримидин-связывающий домен, желтым — С-концевой домен. Голубым окрашены указанные на рис. 2, б пептиды ОАДГ, которые были определены в частично очищенном препарате ОАДГ печени среди белков с мол. массой 70 кДа

Полученные результаты свидетельствуют о том, что изоформа ОАДГ 70 кДа может быть продуктом *DHTKD1*, возникающим вследствие альтернативного старта транскрипции или сплайсинга мРНК. Кроме того, она может быть продуктом специфического протеолиза, при котором происходит отрезание N-концевого фрагмента белка. Функциональность 70 кДа изоформы остается под вопросом. У эукариотических ОГДГ N-концевой фрагмент участвует в образовании полиферментного комплекса, и протеолитическое удаление этого фрагмента делает невозможным протекание полной реакции комплекса [30]. Таким образом, существование изоформы 70 кДа может означать наличие у ОАДГ функций, которые не требуют формирования полиферментного комплекса. К таким функциям относятся, например, неокислительные реакции декарбоксилирования 2-оксокислот, включающие предсказанные для ОАДГ карболигазные реакции [1]. Следует отметить, что неокислительное де-

карбоксилирование 2-оксоглутарата, ведущее к образованию сукцинилполуальдегида или к конденсации продукта декарбоксилирования с глиоксидом в карболигазной реакции (рис. 5), достаточно сильно выражены для микобактериальной ОГДГ, обнаруживающей значительную степень структурного сходства с ОАДГ по результатам нашего филогенетического анализа (рис. 1). Биологическое значение такой неокислительной функции ОАДГ у животных может объяснять высокое содержание изоформы с массой 70 кДа в сердце (рис. 2, а), где скорость катализируемой комплексом полной реакции окислительного декарбоксилирования 2-оксоадипата (реакция (1) при его низкой концентрации, насыщающей только для ОАДГ, но не для ОГДГ, близка к нулю [3]. В этих условиях скорость полной реакции окислительного декарбоксилирования 2-оксоадипата измерима лишь для препарата из печени [3], где мы детектировали обе изоформы ОАДГ (рис. 2, а).

Таким образом, изоформа ОАДГ 70 кДа может быть необходима для реализации неокислительной функции ОАДГ (рис. 5), которая не требует образования полиферментного комплекса, необходимого для осуществления окислительного декарбоксилирования. Содержание же изоформы 130 кДа коррелирует с каталитическим превращением 2-оксоадипата в полной реакции окислительного декарбоксилирования (реакция 1).

Характеристика ОАДГ человека, продуцируемой при экспрессии *DHDKD1* в эукариотической или бактериальной системе. При экспрессии гена *DHDKD1* человека в эукариотической системе *Pichia pastoris* мы не наблюдали низкомолекулярной полосы белка ОАДГ. Более того, мол. масса наработанного белка была близка к рассчитанной по последовательности мол. массе 100 кДа (рис. 6, а). Аналогичный результат был получен при экспрессии *DHDKD1* в клетках *E. coli* (рис. 6, б).

Поскольку при экспрессии гена *DHDKD1* человека как в бактериальной, так и в дрожжевой системах, получаемая ОАДГ представлена лишь одной полосой белка с молекулярной массой около 100 кДа (Рис. 6), очевидно, что образование существующих в тканях животных изоформ ОАДГ не происходит в использованных про-

эукариотических системах продукции рекомбинантных белков (рис. 2, рис. 6). Обнаруженная регуляция ОАДГ животных указывает на значительные ограничения исследований получаемой генно-инженерными методами ОАДГ для понимания биологических функций и механизмов регуляции данного белка.

Таким образом, в данной работе проведено сравнение свойств ОАДГ в тканях крысы и рекомбинантной ОАДГ человека, полученной в дрожжевой или бактериальной системе экспрессии. С помощью антител показано, что структура присутствующей в тканях животных ОАДГ значительно модифицирована по сравнению со структурой фермента, получаемого в бактериях или дрожжах. В первом случае ОАДГ представлена двумя изоформами с мол. массами 130 и 70 кДа, тогда как во втором случае мол. масса ОАДГ близка к ожидаемой мол. массе 100 кДа. Присутствие изоформ ОАДГ в тканях животных свидетельствует о специфической регуляции экспрессии гена *DHDKD1* и/или посттрансляционных модификациях кодируемого им белка в тканях млекопитающих. Функциональное значение такой регуляции может быть связано с реализацией неокислительной функции ОАДГ млекопитающих.

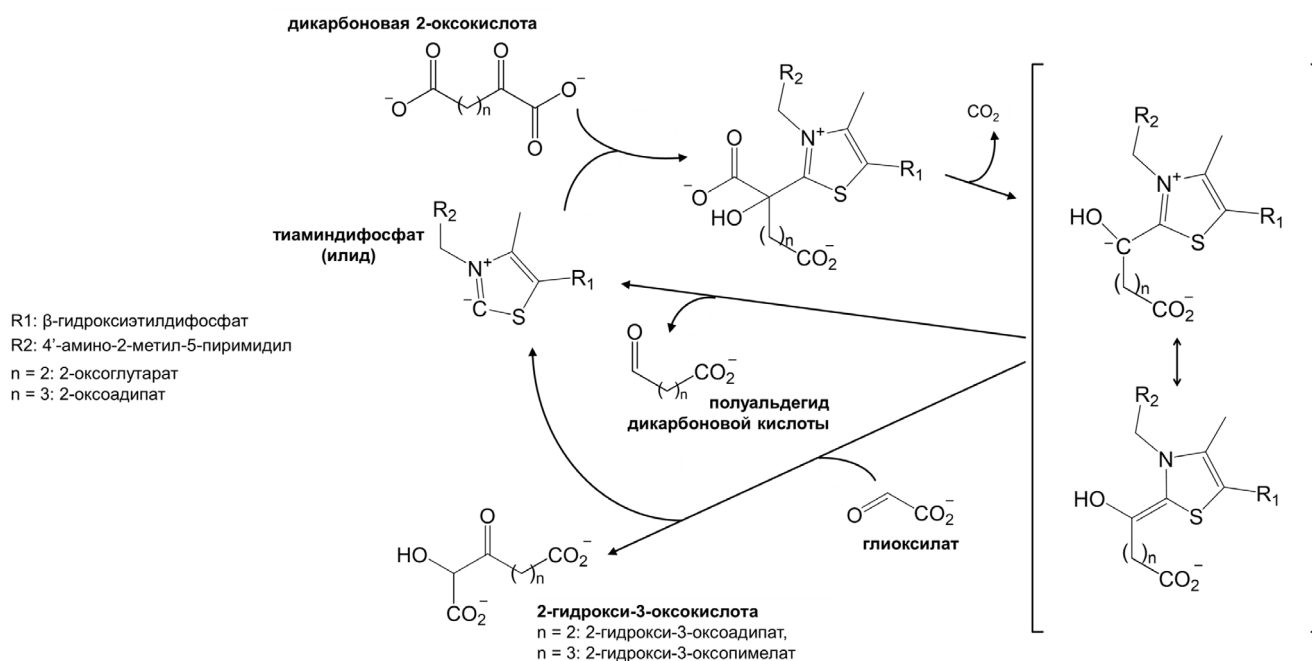
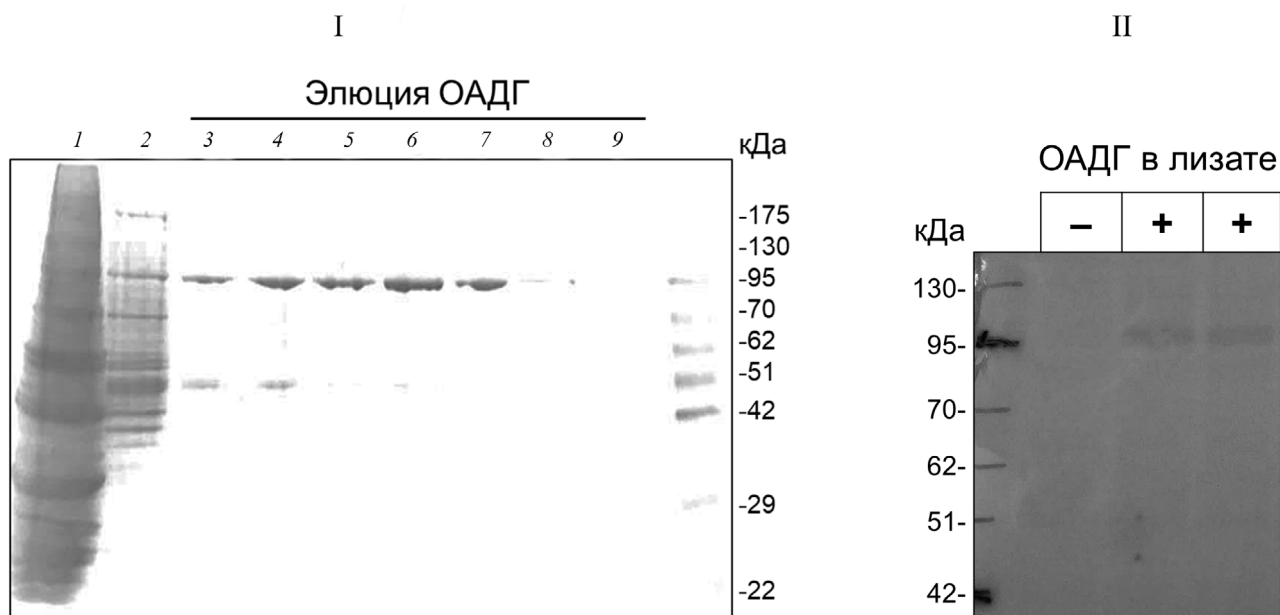


Рис. 5. Схема неокислительных превращений дикарбоновых 2-оксокислот, которые может катализировать ОАДГ. Образующийся в активном центре ОАДГ илидтиаминдифосфата взаимодействует с 2-оксоглутаратом или 2-оксоадипатом, катализируя их декарбоксилирование. Интермедиат реакции, стабилизированный резонансным переходом между его карбанионной и енаминной формами, показан в квадратных скобках. В отсутствие субстратов-акцепторов этот интермедиат распадается с образованием полуальдегида дикарбоновой кислоты. При наличии в среде соединений с активированным атомом углерода, например, глиоксилата, дегидрогеназы дикарбоновых 2-оксокислот могут катализировать карболигандную реакцию. На рисунке представлена реакция с глиоксилатом, где образуется 2-гидрокси-3-оксокислота

а

P. pastoris

б

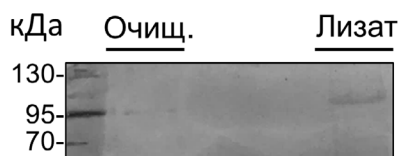
E. coli

Рис. 6. ОАДГ человека, продуцируемая при экспрессии гена *DHDKD1* в дрожжах *P. pastoris* (а) или бактериях *E. coli* (б). I) Очистка ОАДГ человека, полученной в *P. pastoris*, с помощью аффинной хроматографии: 1 – дрожжевой лизат, 2–9 – фракции элюции ОАДГ с Ni-NTA колонки с постепенным повышением концентрации имидазола в буфере элюции от 30 мМ (фракция 2) до 250 мМ (фракция 9). Белок на геле окрашен по методу Кумасси [31]. II) Иммуноблот в лизатах *P. pastoris* до и после экспрессии *DHDKD1* человека; б – иммуноблот очищенного препарата ОАДГ (очищ.) и лизата *E. coli* BL21(DE3) после экспрессии *DHDKD1* человека

Финансирование. Данная работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 18-54-7812) и CNR (грант SAC.AD002.020.017).

Благодарности. Авторы выражают благодарность А.В. Граф и М.В. Масловой (МГУ им. М.В. Ломоносова) за предоставление образцов тканей крыс, использованных в данном исследовании.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. В частности, все эксперименты с животными проводили с соблюдением этических норм согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденным директивой Евросоюза 2010/63/EU. Эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ им. М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bunik, V. I., and Degtyarev, D. (2008) Structure-function relationships in the 2-oxo acid dehydrogenase family: substrate-specific signatures and functional predictions for the 2-oxoglutarate dehydrogenase-like proteins, *Proteins*, 71, 874-890, doi: 10.1002/prot.21766.
2. Tsepkova, P. M., Artiukhov, A. V., Boyko, A. I., Aleshin, V. A., Mkrtychyan, G. V., Zvyagintseva, M. A., Ryabov, S. I., Ksenofontov, A. L., Baratova, L. A., Graf, A. V., and Bunik, V. I. (2017) Thiamine induces long-term changes in amino acid profiles and activities of 2-oxoglutarate and 2-

- oxoadipate dehydrogenases in rat brain, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 723-736, doi: 10.1134/S0006297917060098.
3. Artiukhov, A. V., Grabarska, A., Gumbarewicz, E., Aleshin, V. A., Kahne, T., Obata, T., Kazantsev, A. V., Lukashev, N. V., Stepulak, A., Fernie, A. R., and Bunik, V. I. (2020) Synthetic analogues of 2-oxo acids discriminate metabolic contribution of the 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases in mammalian cells and tissues, *Sci. Rep.*, **10**, 1886, doi: 10.1038/s41598-020-58701-4.
 4. Nemeria, N. S., Gerfen, G., Yang, L., Zhang, X., and Jordan, F. (2018) Evidence for functional and regulatory cross-talk between the tricarboxylic acid cycle 2-oxoglutarate dehydrogenase complex and 2-oxoadipate dehydrogenase on the l-lysine, l-hydroxylysine and l-tryptophan degradation pathways from studies *in vitro*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1859**, 932-939, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.05.001.
 5. Nemeria, N. S., Gerfen, G., Nareddy, P. R., Yang, L., Zhang, X., Szostak, M., and Jordan, F. (2018) The mitochondrial 2-oxoadipate and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes share their E2 and E3 components for their function and both generate reactive oxygen species, *Free Radic. Biol. Med.*, **115**, 136-145, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.018.
 6. Danhauser, K., Sauer, S. W., Haack, T. B., Wieland, T., Staufner, C., Graf, E., Zschocke, J., Strom, T. M., Traub, T., Okun, J. G., Meitinger, T., Hoffmann, G. F., Prokisch, H., and Kolker, S. (2012) DHTKD1 mutations cause 2-aminoadipic and 2-oxoadipic aciduria, *Am. J. Hum. Genet.*, **91**, 1082-1087, doi: 10.1016/j.ajhg.2012.10.006.
 7. Stiles, A. R., Venturoni, L., Mucci, G., Elbalalesy, N., Wootner, M., Goodman, S., and Abdenur, J. E. (2016) New cases of DHTKD1 mutations in patients with 2-ketoadipic aciduria, *JIMD Rep.*, **25**, 15-19, doi: 10.1007/8904_2015_462.
 8. Amsterdam, A., Nissen, R. M., Sun, Z., Swindell, E. C., Farrington, S., and Hopkins, N. (2004) Identification of 315 genes essential for early zebrafish development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12792-12797, doi: 10.1073/pnas.0403929101.
 9. Yap, Z. Y., Strucinska, K., Matsuzaki, S., Lee, S., Si, Y., Humphries, K., Tarnopolsky, M. A., and Yoon, W. H. (2020) A biallelic pathogenic variant in the *OGDH* gene results in a neurological disorder with features of a mitochondrial disease, *J. Inherit. Metab. Dis.*, doi: 10.1002/jimd.12248.
 10. Xu, W., Zhu, H., Gu, M., Luo, Q., Ding, J., Yao, Y., Chen, F., and Wang, Z. (2013) DHTKD1 is essential for mitochondrial biogenesis and function maintenance, *FEBS Lett.*, **587**, 3587-3592, doi: 10.1016/j.febslet.2013.08.047.
 11. Plubell, D. L., Fenton, A. M., Wilmarth, P. A., Bergstrom, P., Zhao, Y., Minnier, J., Heinecke, J. W., Yang, X., and Pamir, N. (2018) GM-CSF driven myeloid cells in adipose tissue link weight gain and insulin resistance via formation of 2-aminoadipate, *Sci. Rep.*, **8**, 11485, doi: 10.1038/s41598-018-29250-8.
 12. Timmons, J. A., Atherton, P. J., Larsson, O., Sood, S., Blokhin, I. O., Brogan, R. J., Volmar, C. H., Josse, A. R., Slentz, C., Wahlestedt, C., Phillips, S. M., Phillips, B. E., Gallagher, I. J., and Kraus, W. E. (2018) A coding and non-coding transcriptomic perspective on the genomics of human metabolic disease, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 7772-7792, doi: 10.1093/nar/gky570.
 13. Lim, J., Liu, Z., Apontes, P., Feng, D., Pessin, J. E., Sauve, A. A., Angeletti, R. H., and Chi, Y. (2014) Dual mode action of mangiferin in mouse liver under high fat diet, *PLoS One*, **9**, e90137, doi: 10.1371/journal.pone.0090137.
 14. Xu, W. Y., Zhu, H., Shen, Y., Wan, Y. H., Tu, X. D., Wu, W. T., Tang, L., Zhang, H. X., Lu, S. Y., Jin, X. L., Fei, J., and Wang, Z. G. (2018) DHTKD1 deficiency causes Charcot-Marie-Tooth disease in mice, *Mol. Cell. Biol.*, **38**, doi: 10.1128/MCB.00085-18.
 15. O'Neill, E., Chiara Goisis, R., Haverty, R., and Harkin, A. (2019) L-alpha-aminoadipic acid restricts dopaminergic neurodegeneration and motor deficits in an inflammatory model of Parkinson's disease in male rats, *J. Neurosci. Res.*, **97**, 804-816, doi: 10.1002/jnr.24420.
 16. Graf, A., Kabysheva, M. S., Klimuk, E. I., Trofimova, L., Dunaeva, T., Zundorf, G., Kahlert, S., Reiser, G., Storozhevyykh, T. P., Pinelis, V. G., Sokolova, N., and Bunik, V. (2009) Role of 2-oxoglutarate dehydrogenase in brain pathologies involving glutamate neurotoxicity, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **61**, 80-87, doi: 10.1016/j.molcatb.2009.02.016.
 17. Musayev, F. N., Di Salvo, M. L., Ko, T. P., Schirch, V., and Safo, M. K. (2003) Structure and properties of recombinant human pyridoxine 5'-phosphate oxidase, *Protein Sci.*, **12**, 1455-1463, doi: 10.1110/ps.0356203.
 18. Wu, S., and Letchworth, G. J. (2004) High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol, *Biotechniques*, **36**, 152-154, doi: 10.2144/04361DD02.
 19. Aleshin, V. A., Mkrtychyan, G. V., Kaehne, T., Graf, A. V., Maslova, M. V., and Bunik, V. I. (2020) Diurnal regulation of the function of the rat brain glutamate dehydrogenase by acetylation and its dependence on thiamine administration, *J. Neurochem.*, **153**, 80-102, doi: 10.1111/jnc.14951.
 20. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410, doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
 21. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nkya, C., and Tamura, K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Mol. Biol. Evol.*, **35**, 1547-1549, doi: 10.1093/molbev/msy096.
 22. Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction, *Nat. Protoc.*, **5**, 725-738, doi: 10.1038/nprot.2010.5.
 23. Payne, S. H., and Loomis, W. F. (2006) Retention and loss of amino acid biosynthetic pathways based on analysis of whole-genome sequences, *Eukaryot. Cell*, **5**, 272-276, doi: 10.1128/EC.5.2.272-276.2006.
 24. Bunik, V. (2017) *Vitamin-Dependent Multienzyme Complexes of 2-Oxo Acid Dehydrogenases: Structure, Function, Regulation and Medical Implications*, Hauppauge, NY, Nova Science Publishers Inc.
 25. Bunik, V., Shoubnikova, A., Bisswanger, H., and Follmann, H. (1997) Characterization of thioredoxins by sodium dodecyl sulfate-slab gel electrophoresis and high performance capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **18**, 762-766, doi: 10.1002/elps.1150180517.
 26. Bonacci, T., Audebert, S., Camoin, L., Baudelet, E., Bidaut, G., Garcia, M., Witzel, H., Perkins, N. D., Borg, J. P., Iovanna, J. L., and Soubeyran, P. (2014) Identification of new mechanisms of cellular response to chemotherapy by tracking changes in post-translational modifications by ubiquitin and ubiquitin-like proteins, *J. Proteome Res.*, **13**, 2478-2494, doi: 10.1021/pr401258d.
 27. Akimov, V., Barrio-Hernandez, I., Hansen, S. V. F., Hallenborg, P., Pedersen, A. K., Bekker-Jensen, D. B., Puglia, M., Christensen, S. D. K., Vanselow, J. T., Nielsen, M. M., Kratchmarova, I., Kelstrup, C. D., Olsen, J. V., and Blagoev, B. (2018) UbiSite approach for comprehensive mapping of lysine and N-terminal ubiquitination sites, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 631-640, doi: 10.1038/s41594-018-0084-y.
 28. Udeshi, N. D., Mertins, P., Svinikina, T., and Carr, S. A. (2013) Large-scale identification of ubiquitination sites by

- mass spectrometry, *Nat. Protoc.*, **8**, 1950-1960, doi: 10.1038/nprot.2013.120.
29. Hornbeck, P. V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J. M., Latham, V., and Skrzypek, E. (2015) PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations, *Nucleic Acids Res.*, **43**, D512-520, doi: 10.1093/nar/gku1267.
30. McCartney, R. G., Rice, J. E., Sanderson, S. J., Bunik, V., Lindsay, H., and Lindsay, J. G. (1998) Subunit interactions in the mammalian alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex. Evidence for direct association of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase and dihydrolipoamide dehydrogenase components, *J. Biol. Chem.*, **273**, 24158-24164.
31. Arndt, C., Koristka, S., Feldmann, A., Bartsch, H., and Bachmann, M. (2012) Coomassie-Brilliant Blue staining of polyacrylamide gels, *Methods Mol. Biol.*, **869**, 465-469, doi: 10.1007/978-1-61779-821-4_40.

ISOFORMS OF THE *DHTKD1*-ENCODED 2-OXOADIPATE DEHYDROGENASE, IDENTIFIED IN ANIMAL TISSUES, ARE NOT OBSERVED UPON THE HUMAN *DHTKD1* EXPRESSION IN BACTERIAL OR YEAST SYSTEMS*

A. I. Boyko^{1}, A. V. Artiukhov^{1,2}, T. Kaehne³, M. L. di Salvo⁴, M. C. Bonaccorsi di Patti⁴, R. Contestabile⁴, A. Tramonti^{4,5}, and V. I. Bunik^{1,2,6**}**

¹ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: boiko.sash@gmail.com, bunik@belozersky.msu.ru

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

³ Institute of Experimental Internal Medicine, Otto-von-Guericke University, 39120 Magdeburg, Germany

⁴ Department of Biological Sciences A. Rossi Fanelli, Sapienza University, 00185 Rome, Italy

⁵ Institute of Molecular Biology and Pathology, Council of National Research, 00185 Rome, Italy

⁶ Department of Biological Chemistry, Sechenov First Moscow State Medical University, 119146 Moscow, Russia

Received June 16, 2020

Revised June 25, 2020

Accepted June 26, 2020

Unlike the *OGDH*-encoded 2-oxoglutarate dehydrogenase (OGDH), which is an essential enzyme present in all animal tissues, expression of the *DHTKD1*-encoded isoenzyme, 2-oxoadipate dehydrogenase (OADH), depends on a number of factors, and mutant *DHTKD1* phenotypes are rarely manifested. Physiological significance of OADH is also obscured by the fact that both isoenzymes transform 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate. By analogy with other members of the 2-oxo acid dehydrogenases family, OADH is assumed to be a component of the multienzyme complex that catalyzes oxidative decarboxylation of 2-oxoadipate. This study aims at molecular characterization of OADH from animal tissues. Phylogenetic analysis of 2-oxo acid dehydrogenases reveals OADH only in animals and *Dictyostelium discoideum* slime mold, within a common branch with bacterial OGDH. Examination of partially purified animal OADH by immunoblotting and mass spectrometry identifies two OADH isoforms with molecular weights of about 130 and 70 kDa. These isoforms are not observed upon the expression of human *DHTKD1* protein in either bacterial or yeast system, where the synthesized OADH is of expected molecular weight (about 100 kDa). Thus, the OADH isoforms present in animal tissues, may result from the animal-specific regulation of the *DHTKD1* expression and/or post-translational modifications of the encoded protein. Mapping of the peptides identified in the OADH preparations, onto the protein structure suggests that the 70-kDa isoform is truncated at the N-terminus, but retains the active site. Since the N-terminal domain of OGDH is required for the formation of the multienzyme complex, it is possible that the 70-kDa isoform catalyzes non-oxidative transformation of dicarboxylic 2-oxo acids that does not require the multienzyme structure. In this case, the ratio of the OADH isoforms in animal tissues may correspond to the ratio between the oxidative and non-oxidative decarboxylation of 2-oxoadipate.

Keywords: DHTKD1, OGDH, carboligase, isoenzyme of 2-oxoglutarate dehydrogenase, isoform of 2-oxoadipate dehydrogenase, post-translational modifications